



09/719758

REC'D 30 JUN 1999

WIPO PCT

FR 99/01453

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 MARS 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

17 JUN 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 07617 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

17 JUIN 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale

☒ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

07/08/1997

ST98017

0155717036

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA PROTEINE G3BP, ET LEURS UTILISATIONS

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN 3 0 4 4 6 3 2 8 4

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RHONE-POULENC RORER S.A.

Forme juridique

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DERNONCOUR Roxane

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9807617

ST98017

TITRE DE L'INVENTION :

ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA PROTEINE G3BP, ET LEURS
UTILISATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY (FRANCE)

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

PARKER Fabienne :

27 rue de la Fonte - 92160 ANTONY (FRANCE)

KENIGSBERG Mireille :

69 rue de la Garenne - 91230 MONTGERON (FRANCE)

DUCHESNE Marc :

71 rue du Général de Larminat - 94370 SUCY EN BRIE (FRANCE)

BARLAT Isabelle :

14 rue du 8 mai 1945 - 94510 LA QUEUE EN BRIE (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 17 septembre 1998



DERNONCOUR Roxane

ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LA PROTEINE 5 G3BP, ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G3BP ainsi que les lignées cellulaires les produisant. L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps ou de leurs dérivés pour l'obtention
10 de médicaments et de réactifs de diagnostic.

Les produits des gènes ras, généralement désignés protéines p21Ras, jouent un rôle clé dans le contrôle de la division cellulaire chez tous les organismes eucaryotes où ils ont été recherchés. Certaines modifications spécifiques de ces protéines leur font perdre leur contrôle normal et les conduisent à devenir oncogéniques. Ainsi, un
15 grand nombre de tumeurs humaines ont été associées à la présence de gènes ras modifiés. De même, une surexpression des protéines p21Ras peut conduire à un dérèglement de la prolifération cellulaire. Globalement, les protéines p21Ras sont impliquées dans 30% des cancers humains.

La compréhension du rôle exact de ces protéines p21Ras constitue donc un
20 des objectifs cibles de la recherche dans le domaine de l'oncologie.

Le modèle dont on dispose actuellement pour expliquer le fonctionnement des protéines p21Ras repose sur des analogies qu'elles partagent avec les protéines G de transduction. Il existe dans les cellules un équilibre entre les protéines p21 actives, liées à du GTP et les formes inactives, ayant fixé du GDP. Dans une cellule
25 quiescente, où les protéines Ras ne sont pas sollicitées, la majorité d'entre elles sont

sous forme GDP. Lorsque la cellule est stimulée, le facteur d'échange des nucléotides, GEF, devient plus actif et facilite l'évacuation du GDP et son remplacement par du GTP. La protéine adopte alors une conformation active qui lui permet de reconnaître et de stimuler son effecteur, la protéine GAP "GTPase activating protein". Le

5 complexe Ras-GTP-GAP interagit vraisemblablement à son tour avec une ou d'autres protéine(s) permettant ainsi la transmission du signal qui entraîne une réponse biologique de la cellule. L'association de Ras-GTP avec GAP déclenche simultanément l'hydrolyse du GTP et le retour de la protéine Ras vers la forme inactive, GDP.

10 Dans le cas des protéines p21Ras oncogènes, la mutation qu'elles portent empêche le retour à l'état inactif. L'équilibre est dans ce dernier cas, déplacé vers la forme active de Ras.

Cet équilibre complexe entre les formes active et inactive des p21Ras est contrôlé à la fois par des facteurs inhérents aux propriétés biochimiques des protéines

15 Ras (affinité relative pour le GDP et le GTP, vitesse d'échange des nucléotides ...) et des facteurs externes modulant leur activité comme notamment la protéine GAP.

La protéine GAP est une protéine cytosolique présente chez tous les organismes eucaryotes qui possède donc la faculté d'accélérer fortement l'hydrolyse du GTP, lié à la protéine p21 normale (Trahey et Mc Cormick 1987). Elle possède

20 deux domaines assurant des fonctions distinctes. Son extrémité carboxy-terminale porte l'activité catalytique qui fixe les protéines Ras et augmente leur activité GTPase. Sur son autre extrémité, en aval de la partie amino-terminale, se trouve une juxtaposition de domaines SH2 et SH3 qui sont susceptibles de participer à des interactions avec d'autres protéines.

25 La demanderesse a déjà identifié une protéine supplémentaire dans la cascade de la signalisation Ras-dépendante. Ainsi, la demande WO96/16169 décrit l'identification, le clonage, le séquençage et la caractérisation d'une protéine capable de lier le domaine SH3 de GAP, désignée G3BP ("GAP-SH3 Binding Protein"). Cette

demande montre en particulier que G3BP est un effecteur de GAP, c'est-à-dire un partenaire intervenant en aval dans la voie de signalisation Ras-dépendante. Ainsi, l'article de Parker et al (Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2561) décrit la séquence de cette protéine, sa capacité à lier GAP, etc. Cette protéine constitue une nouvelle cible majeure dans la mise au point d'approches thérapeutiques anti-cancéreuses.

La protéine G3BP est une protéine cytosolique de 68 kDa exprimée de façon ubiquitaire. La séquence de la protéine G3BP et du gène correspondant sont présentées dans les SEQ ID n°1 et SEQ ID n° 2. Cette protéine de 466 acides aminés appartient à la famille des hnRNP (heterogeneous nuclear RiboNucleoproteins) et contient plusieurs domaines caractéristiques des protéines qui se lient à l'ARN :

- un domaine RRM (aa 342-385) avec les domaines RNP2 (aa 342-347) et RNP1 (aa 378 à 385)
- un domaine riche en acides aminés Arginine , Glycine (aa 429 à 461)
- un domaine auxiliaire acide (aa 144 à 221)

La demanderesse s'est maintenant intéressée au mécanisme d'action de la protéine G3BP. Dans cette optique, la demanderesse a obtenu différents anticorps dirigés contre différents domaines de la protéine G3BP afin d'antagoniser l'activité de G3BP ou de constituer des effecteurs de G3BP.

La présente invention repose d'une part sur la mise en évidence d'une surexpression de la protéine G3BP dans les cellules tumorales et dans les tumeurs humaines (adénocarcinome du colon, et tumeur du sein) et d'autre part sur la découverte surprenante que certains anticorps dirigés contre la protéine G3BP sont capables d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales humaines. De manière inattendue, il a été constaté que ces anticorps induisent l'apoptose dans les cellules tumorales dans lesquelles la protéine G3BP est surexprimée mais se révèlent non toxiques dans les cellules humaines normales, où G3BP est faiblement exprimée.

Un premier objet de l'invention concerne des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G3BP et capables d'induire l'apoptose dans différents types de cellules tumorales.

5 Plus particulièrement, l'invention a pour objet des anticorps monoclonaux capables de reconnaître un épitope situé dans la partie N-terminale de la protéine G3BP. De manière avantageuse, il s'agit d'un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 1 et 144 de la protéine G3BP et de préférence il s'agit d'un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 72 et 144 de la protéine G3BP.

10 Dans un mode particulièrement avantageux, la présente invention concerne des anticorps désignés par l'appellation Mab 1F1 et sécrétés par la lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la C.N.C.M. sous le numéro I-2038 .

L'invention englobe également les anticorps dérivés des anticorps
15 monoclonaux définis ci-avant. Au sens de la présente invention, on entend par anticorps dérivés toute molécule qui comprend l'idiotype des anticorps monoclonaux selon l'invention et notamment les anticorps chimériques, les anticorps simple chaîne et les fragments Fab. De tels anticorps chimériques peuvent être obtenus selon les techniques décrites par Morrison et al., J. Bacteriol. 159 : 870 (1984) ; Neberger et al.,
20 Nature 312:604-608 (1984) ; Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985), incorporées à la présente par référence. Les fragments Fab qui contiennent l'idiotype des anticorps selon l'invention peuvent être générés par toute technique connue de l'homme du métier. Par exemple de tels fragments comportent de manière non limitative : le fragment $F(ab')_2$, fragment qui peut être produit par digestion par la pepsine de
25 l'anticorps ; les fragments Fab' qui peuvent être obtenus par réduction des ponts disulfure du fragment $F(ab)_2$, et les fragments Fab qui peuvent être produits par traitement de l'anticorps avec la papaïne et un agent réducteur.

L'invention a également pour objet des anticorps simple chaîne ScFv dérivés des anticorps monoclonaux définis ci-avant. De tel anticorps simple chaîne peuvent être obtenus selon les techniques décrites dans les brevet US 4,946,778, US 5,132,405 et US 5,476,786.

5 L'invention concerne également une séquence d'acides nucléiques comprenant un gène codant pour un anticorps simple chaîne dérivé des anticorps monoclonaux décrits ci-avant. L'obtention de telles séquences et leur utilisation pour l'expression in vivo d'anticorps a été décrite dans la demande WO 94/29446 incorporée par référence à la présente.

10 L'invention a également pour objet des vecteurs viraux ou plasmidiques contenant une séquence d'acide nucléique codant pour un anticorps simple chaîne dérivé des anticorps monoclonaux décrits ci-avant. Plus particulièrement, les vecteurs de l'invention sont d'origine virale, tels que les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de l'herpès, le virus de la vaccine, le virus HSV, etc.

15 L'invention concerne également l'utilisation de séquences d'acides nucléiques codant pour ces ScFv ou de vecteurs les incluant pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement chirurgical ou thérapeutique du corps humain ou animal. Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant un vecteurs, notamment viral, ou une séquence d'acides nucléiques tels
20 que définis ci-avant.

L'invention a également pour objet les lignées d'hybridomes susceptibles de sécréter les anticorps monoclonaux selon l'invention.

L'invention a plus particulièrement pour objet la lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 sécrétant l'anticorps Mab 1F1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la Collection
25 Nationale des Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) sous le numéro I-2038.

L'invention concerne également un procédé de production d'anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales comprenant (1) la fusion de cellules spléniques d'un animal immunisé à l'aide de la protéine G3BP ou d'un fragment comprenant au moins une partie du domaine N-terminal (aa 1-144), avec des cellules myelomateuses dans des conditions permettant la formation d'hybridomes ; (2), la détection et l'isolement de ceux desdits hybridomes qui sécrètent des anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales.

L'invention concerne également l'utilisation des anticorps définis ci-avant pour l'obtention de médicaments. L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation desdits anticorps pour l'obtention d'un médicament destinés au traitement ou à la prévention des désordres hyperprolifératifs.

L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une quantité thérapeutiquement efficace des anticorps selon l'invention, éventuellement mélangés à un support pharmaceutiquement acceptable, ladite quantité étant thérapeutiquement efficace pour induire l'apoptose dans des cellules tumorales.

Les anticorps selon l'invention peuvent également être utilisés comme réactif de diagnostic pour identifier ou doser la protéine G3BP. En effet, il a été constaté que la protéine G3BP est surexprimée dans les cellules tumorales et que cette surexpression constitue un marqueur dans les phénomènes de prolifération cellulaire. Ces anticorps sont donc particulièrement utiles pour diagnostiquer des maladies hyperprolifératives entraînant une surexpression de la protéine G3BP.

L'invention a donc également pour objet l'utilisation des anticorps monoclonaux définis ci-avant comme réactif de diagnostic ainsi qu'un kit de diagnostic immunologique comprenant lesdits anticorps monoclonaux.

Les anticorps peuvent être couplés à des marqueurs chromogènes, fluorescents, biotinylés, radioactifs ou autres ... Les anticorps peuvent être utilisés dans des méthodes d'immunomarquage en immunohistochimie, en cytométrie de flux, pour des dosages radioimmunologiques (RIA) ou immunoenzymatiques (ELISA) et dans tout type de kits de diagnostic connu.

Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples qui vont suivre, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée

10 LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Identification par Western Blot des différents domaines de G3BP reconnus par l'anticorps Mab 1F1

Figure 2 a et 2 b : Comparaison du niveau d'expression de la protéine G3BP dans différentes lignées cellulaires.

Figure 3 : Effet de la microinjection d'anticorps Mab 1F1 dans les cellules HCT116.

MATERIELS ET METHODES

20 Lignées cellulaires utilisées

HCT116: cellules épithéliales issues de carcinome de colon humain présentant un gène *Ki-ras* muté et une mutation du gène suppresseur de tumeur DCC. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Serum de veau foetal, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

Hke-3 et HK2-6 : cellules HCT116 modifiées par délétion du gène *Ki-ras* et qui, de ce fait ont perdu leur pouvoir tumorigène. (ref: Shirasawa,..Sasazuki. (1993) Science 260, 85-88). Milieu de culture requis : DMEM, 10% Serum de veau foetal, 400µg/ml Geneticine, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

- 5 H460 : cellules épithéliales issues de carcinome pulmonaire non à petites cellules humain présentant un gène *Ki-ras* muté. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

- H1299 : provenance ATCC. Cellules épithéliales issues de carcinome pulmonaire humain présentant un gène *N-ras* muté et une délétion du gène p53.
10 Milieu de culture requis : DMEM, 10% Serum de veau foetal, 1% Penicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

HeLa : cellules épithéliales issues de carcinome humain du col de l'utérus ne présentant pas de mutation des gènes *ras*. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

- 15 HT-29 : provenance ATCC. Cellules épithéliales issues de carcinome de colon humain présentant une mutation du gène p53 mais pas de mutations des gènes *ras*. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

- DLD-1 : provenance ATCC. Cellules épithéliales issues de carcinome de colon humain présentant une mutation du gène *Ki-ras* et du gène p53. Milieu de culture requis : DMEM, 10% Sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

- T47 : provenance ATCC. Cellules isolées à partir d'effusion pleurale d'une patiente atteinte de carcinome mammaire. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.
25

BT20 : Cellules issues de carcinome mammaire humain. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

5 MCF-7 : Cellules issues de carcinome mammaire humain. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

T24 : provenance ATCC. Cellules issues de carcinome humain de la vessie, présentant une mutation du gène *Ha-ras*. Milieu de culture requis : RPMI, 10% sérum de veau foetal, 1% Pénicilline/ Streptomycine, 1% Glutamine.

10 NHDF : provenance Boehringer Ingelheim. Normal Human Dermal Fibroblasts (adult) en culture primaire ne présentant pas de gènes mutés. Milieu requis du fournisseur.

EXEMPLES

15 Exemple 1 : Obtention des anticorps monoclonaux

1.1 - Production de la protéine G3BP

Les cultures de cellules SF9 ont été réalisées selon le protocole décrit dans Parker et al (Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2561). Les cellules sont lysées en présence de tampon HNTG (50 mM d'Hépès, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 % de Triton X100, 10
20 % de Glycérol, 1mM de %gCl₂, 1mM d'EGTA; en présence d'inhibiteurs de phosphatases (1mM Na₃VO₄, 10mM de Na₄P₂O₇, 10 mM de NaF) et d'inhibiteurs de protéases (1µg/ml de leupeptine, 1 µg/ml d'inhibiteur de trypsine, 1 µg/ml de pepstatine A, 2 µg/ml d'aprotinine, 10 µg/ml de benzamidine, 1 mM de phénylméthanesulfonyle fluorure, 1 µg/ml d'antipain, 1 µg/ml de chymostatine). Le
25 lysat est centrifugé (15,000 g, 15 min.) et dilué 5 fois dans du tampon de lavage HG

(50 mM Hepes pH 7.5, glycérol 10 %, 1 mM EGTA, en présence d'inhibiteurs de phosphatases et d'inhibiteurs de protéases). Le lysat est ensuite incubé 12 heures en présence du gel Heparin-Sepharose Fast Flow gel (Pharmacia LKB) à raison de 15 mg de protéines par millilitre de gel, équilibré dans le même tampon (50 mM Hepes, 0.030 M NaCl, 0.2 % Triton X100, glycérol 10 %, MgCl₂ 1 mM, 1 mM EGTA). Le complexe est transféré dans une colonne K26 Pharmacia. La colonne est lavée avec 10 volumes de tampon d'équilibration (50 ml/heure), puis les protéines sont éluées en tampon NaCl 100 mM puis en tampon NaCl 600 mM. Les fractions contenant l'activité de liaison GAP-SH3 sont rassemblées, diluées 10 fois en tampon HG et chargées sur une colonne d'agarose-polyribouridylic acid AGPOLY(U), (colonne de type 6, 19 cm² x 1 cm, Pharmacia) à raison de 1.3 mg de protéines par millilitre de gel. La colonne est pré-équilibrée dans le même tampon avec un débit de 5 ml / cm² h⁻¹. Après lavage en tampon HNG (60 mM NaCl), les protéines contaminantes sont éluées avec 229 ml d'un tampon en gradient linéaire de 0.06 à 0.32 M NaCl, et la protéine G3BP est éluee en présence de NaCl 0.7 M. A l'issue de la chromatographie POLY(U), les fractions contenant la protéine G3BP sont rassemblées, diluée 12 fois en présence de tampon phosphate pH 7.5 + inhibiteurs de protéases) et chargées sur une colonne MonoS HR5/5 1 ml (Pharmacia), pré-équilibrée dans le même tampon contenant 60 mM NaCl, à un débit de 30 ml h⁻¹. Après rinçage de la colonne, les protéines sont éluées avec 40 ml d'un tampon en gradient linéaire de 0.06 à 1 M NaCl. La protéine G3BP est éluee entre 0.15 M et 0.2 M NaCl.

1.2 - Protocole d'immunisation des souris

Des souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines ont reçu une injection intrapéritonéale de 25 µg de G3BP au jour J0 de l'immunisation. Une deuxième injection intrapéritonéale a été faite au jour J14 de l'immunisation puis une troisième et quatrième injections aux jours J45 et J80. Une cinquième injection (10 µg de protéine G3BP) est a été faite par voie intra-veineuse au jour J165 et les splénocytes ont été extraits trois jours plus tard et fusionnés. Les splénocytes ont été fusionnés avec des cellules murines de myélome SP2/O-Ag14 d'une part et X63Ag8/653

d'autre part. Le rapport splénocytes/cellules de myélome est de 5 : 1. L'hybridation lymphocytaire est faite en présence de polyéthylèneglycol PEG pm 1500 (concentration finale 40 %). Il a été préparé 16 plaques de 96 puits en présence de 10.000 macrophages péritonéaux de souris Balb/C par puits. Les quantités de
 5 splénocytes utilisées varient entre $2,5 \cdot 10^4$ et 10^5 cellules par puits. Le milieu utilisé contient RPMI 1640 (Biowhittaker et Gibco), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, HAT, hypoxantine 100 mM, aminoptérine 0.4 μ M, thymidine 16 μ M, 220 % sérum de veau foetal décomplémenté, pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 μ g/ml.

10 Les premiers clones apparaissent trois jours après la fusion, le milieu est changé sept jours après la fusion, enfin 10 jours après la fusion, 5000 macrophages sont ajoutés par puits. Les puits dans lesquels un seul hybridome a poussé sont identifiés et les surnageants sont prélevés pour le criblage.

Les surnageants d'hybridome issus de la fusion sont criblés par Western Blot.
 15 Des extraits cellulaires (50 μ g) de cellules ER22 et de cellules HCT116, la protéine G3BP recombinante ainsi qu'une protéine contrôle SAM68 ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % de dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF Millipore Corpo.). La liaison non spécifique est bloquée par 2 % de lait écrémé dans
 20 du tampon ECL (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % de Tween 20) pendant 2 heures, à température ambiante.

Les membranes sont ensuite incubées avec les différents surnageants dilués au 1/50 ème dans le tampon bloquant pendant une nuit à 4 °C. Après lavage avec le tampon ECL - 0.05 % Tween 20, les protéines liées sont détectées par incubation avec
 25 un anticorps anti-souris conjugué à une peroxidase et du réactif chemiluminescent ECL (NEN Life Science Product).

Trois hybridomes ont été retenus à l'issue de ce criblage. Il s'agit des hybridomes G3B 1E1, G3B 1F1 1D1 et G3B11H7.

Exemple 2 - Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps Mab 1F1.

5 Différents fragments de la protéine G3BP ont été produits dans un système d'expression en cellule d'insectes (SF9) infectées par un baculovirus recombinant selon la technique décrite dans Parker et al (Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 2561). Il s'agit des fragments « 1 » (aa 72 - 350), « 2 » (aa 72 - 235), « 3 » (aa 144 - 341), « 4 » (aa 236 - 350), et « 5 » (aa 299 - 466). Des expériences de Western blot ont été réalisées à
10 partir de ces fragments produits en système baculovirus .

2.1 - Détection des protéines par Western Blot

 Après élimination du milieu de culture, les cellules en prolifération sont lavées deux fois en tampon phosphate à 4 °C. La lyse est effectuée directement sur les boîtes de culture en présence de 1 ml de tampon HNTG (HEPES pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, glycerol 10 %, MgCl₂ 1mM, 1 mM + inhibiteurs
15 de phosphatases (Na₃VO₄ 1 mM, Na₄ P₂O₇ 10 mM, NaF 10 mM) + inhibiteurs de protéases (leupeptine 1 µg/ml, inhibiteur de trypsine 1 µg/ml, pepstatine A 1 µg/ml, benzamidine 10 µg/ml, phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM, antipaine 1 µg/ml chymostatin 1 µg/ml). Les protéines sont séparées sur gel d'électrophorèse acrylamide
20 Sodium Dodecyl-Sulfate (SDS)-Polyacrylamide (PAGE) de 7,5 % (16 heures, 60 volts) les protéines sont ensuite transférées sur membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) Millipore Corp.) par une méthode de transfert semi-liquide. Le transfert est réalisé à 4 °C, pendant 3 heures, sous tension de 60 volts, dans un tampon de transfert Tris Base 25 mM, Glycine 192 , SDS 0.15 % méthanol 20 %. La
25 membrane est rincée en PBS puis saturée dans du PBS additionné de 0.05% de tween 20 et de 2 % de lait écrémé pendant 2 heures à température ambiante. La membrane est incubée pendant 12 h à 4 °C, dans un tampon ECL (20 mM TRIS, pH 7.4, 150

mM NaCl) + 0.05 % Tween 20 + 2 % lait écrémé, contenant le premier anticorps. L'anticorps MAB 1F1 est dilué au 1/10000 ème. La membrane est ensuite rincée 4 ou 5 fois pendant 10 minutes, à température ambiante dans un tampon ECL + 0.05 % Tween 20. Le second anticorps (anticorps anti-souris) est ensuite ajouté en présence
5 de ECL + 0.05 % Tween 20 pendant 45 minutes à température ambiante. Les anticorps sont couplés à la peroxydase qui permet la révélation des protéines par la technique de l'Enhanced ChemiLuminescence (ECL). La membrane est rincée 4 ou 5 fois dans du tampon PBS + 0.05 % Tween 20, incubée 1 minute dans le réactif ECL. La révélation est effectuée selon les recommandations du fournisseur (NEN Life
10 Science Product).

Les résultats sont présentés sur la figure 1 et montrent que l'anticorps Mab 1F1 permet la détection des fragments « 1 » (aa 72 - 350) et « 2 » (aa 72 - 235). Le fragment « 3 » (aa 144 - 341) central comportant une zone commune au fragment « 2 » n'est pas reconnu. Les fragments « 4 » (aa 236 - 350) et « 5 » (aa 299 - 466) ne
15 sont pas non plus reconnus.

Ces résultats montrent que l'épitope reconnu par l'anticorps Mab 1F1 est localisé dans la région N- terminale de la protéine de G3BP, dans la zone correspondant aux 144 premiers acides aminés et plus particulièrement dans la zone comportant les 100 premiers amino acides situés en amont du domaine acide (aa 144 -
20 221) de la protéine G3BP.

Exemple 3 : niveau d'expression de la protéine G3BP dans différentes lignées cellulaires.

Le niveau d'expression de la protéine G3BP a été étudié dans des tumeurs
25 colorectales humaines et dans différentes lignées tumorales.

3.1 - Niveau d'expression de G3BP dans différentes lignées cellulaires humaines.

Pour cette expérience, les cellules en culture sont récoltées par scrapping et centrifugées 5 mn à 2000 t/mn pour les collecter en culot. Elles sont alors lysées dans un tampon Hepès 10 mM pH7.2, KCl 140 mM, MgCl₂ 5 mM, NP40 0.2% et inhibiteurs de protéases pendant 45 mn à 4 °C. Les lysats sont centrifugés à 14 000t/mn pendant 10 mn et les surnageants sont prélevés. Un dosage de protéines est effectué et les surnageants sont dénaturés en tampon de Laemmli 4X et traités 10 mn à 95°C.

10 L'équivalent de 50 µg de protéines des différents lysats est déposé par puits d'un minigel SDS-PAGE Novex 10% d'acrylamide, 10 puits et 1.5mm d'épaisseur.

Après migration, électrotransfert sur membrane de PVDF, et passivation des membranes en tampon TTBS [TRIS 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1 %, azide de sodium 0.02 %] contenant 3 % de BSA, les échantillons sont soumis à un Western-blot :

Les membranes sont incubées pendant 2 heures avec l'anticorps Mab 1F1 dilué à 0.2µg/ml dans du tampon TTBS contenant 3% de BSA, elles sont ensuite rincées quatre fois avec du TTBS pendant 10 mn, puis incubées 1 heure avec un anticorps anti-souris marqué à la peroxydase et à nouveau rincées quatre fois avec du TTBS pendant 10 mn. Les membranes sont ensuite révélées avec le kit ECL (chimie luminescence) NEN-Dupont sur film ECL Amersham.

Les résultats sont présentés à la figure 2 a. Le film obtenu montre la surexpression de la protéine G3BP dans toutes les lignées tumorales testées, par rapport à la lignée de fibroblastes normaux NHDF. Le niveau de cette surexpression est variable d'une lignée à l'autre mais n'est pas dépendant de l'état d'activation des gènes *ras* dans ces lignées ; les lignées cellulaires présentant un gène *Ki-ras* muté comme les HCT116, H460 ou DLD-1, expriment plus ou moins fortement la protéine

G3BP et les lignées cellulaires ne présentant pas de mutation des gènes *ras* comme les HeLa ou HT29, ont un niveau d'expression de G3BP tout aussi fort et variable.

On peut néanmoins constater que les cellules HKe-3 et HK2-6 dans lesquelles le gène *Ki-ras* a été délété, voient le niveau d'expression de G3BP diminuer par rapport aux cellules dont elles sont issues, les HCT116, sans pour autant qu'il y ait extinction de cette expression.

Niveau d'expression de G3BP dans les biopsies humaines.

Les prélèvements de tissus sains ou tumoraux ont été fixés sur lame. La solubilisation des échantillons est effectuée par un dépôt de 40 µl de tampon HNTG sur chaque lame au niveau du tissu. Les extraits sont centrifugés à 14000t/min pendant 10 minutes et les surnageants sont prélevés. Les protéines sont dosées et dénaturées par du tampon de Laemmli 4X par un traitement à la chaleur 95 °C pendant 10 minutes.

Des échantillons de 20 à 30 µg de protéines ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 7,5 % de dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) puis transférés sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF Millipore Corpo.). La liaison non spécifique est bloquée par 2 % de lait écrémé dans du tampon ECL (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % de Tween 20) pendant 2 heures, à température ambiante.

Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps Mab 1F1 dilué à 0.2 µg/ml dans le tampon bloquant pendant une nuit à 4 °C. Après lavage avec le tampon ECL - 0.05 % Tween 20, les protéines liées sont détectées par incubation avec un anticorps anti-souris conjugué à une peroxidase et du réactif chemiluminescent ECL (NEN Life Science Product)

Les résultats présentés sur la figure 2 b montrent que la protéine G3BP est surexprimée dans les adénomes moyennement et bien différenciés.

Exemple 4 : Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la viabilité des cellules tumorales humaines.

Cet exemple illustre la propriété des anticorps selon l'invention à induire
5 l'apoptose dans différents types de cellules tumorales.

L'anticorps monoclonal Mab 1F1 a été injecté selon le protocole décrit ci-après. La solution à injecter est dialysée contre du PBS, passée sur filtre 0.45µm UltraFree Millipore et centrifugée (5 mn à 14000 rpm) avant d'être introduite dans le microcapillaire à l'aide d'une pointe effilée « microloader » (Roucaire). Le temps
10 d'injection est réglé de 0,1 à 0,3 seconde et la pression d'injection entre 50 hPa et 150 hPa selon la taille des cellules. Environ 200 cellules ont été injectées par condition.

Les cellules HCT116, H460, H1299, HeLa ou HKe-3 ont été microinjectées par 10 mg/ml d'anticorps monoclonal Mab 1F1 puis filmées et enregistrées par vidéomicroscopie (à 2 images par minute) pendant 3 jours après injection. A la lecture
15 du film, l'évolution des cellules injectées est observable (divisions, morts cellulaires, changements morphologiques) et quantifiable (nombre de cellules se divisant ou mortes par heure). Seules les cellules qui se détachent du support après condensation et fragmentation (événements observables des cellules apoptotiques) sont comptées.

Les résultats obtenus avec l'injection de l'anticorps Mab 1F1 dans les cellules
20 HCT 116 sont reportés dans la figure 3. On constate un pourcentage élevé de mort cellulaire induite à partir de douze heures après l'injection de l'anticorps Mab 1F1, avec un pic entre 24 et 48 heures.

Des doses différentes d'anticorps Mab 1F1 ont été testées dans les cellules HCT116. De 10 mg/ml à 3 mg/ml, l'effet d'induction de mort cellulaire est
25 équivalent, c'est-à-dire que l'anticorps Mab 1F1 induit la mort cellulaire d'au moins 50% des cellules injectées. A 1 mg/ml d'anticorps, l'effet est fortement diminué.

Si les cellules HCT116 sont injectées par une immunoglobuline de souris à la concentration de 10 mg/ml comme contrôle, aucune mort n'est constatée et les cellules injectées continuent à se diviser normalement.

5 Cet effet toxique de l'anticorps Mab 1F1 dans les cellules HCT116 a été confirmé par l'utilisation de la méthode « TUNEL » en fluorescence, qui permet de détecter spécifiquement les coupures dans l'ADN des cellules entrant en apoptose:

Les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre quadrillées (cellocates-Roucaire) et placées dans des plaques 4 puits. 2 jours après l'ensemencement, les cellules sont injectées sur ces lamelles par l'anticorps Mab 1F1
10 ou avec une immunoglobuline de souris, comme contrôle, à 10 mg/ml. Après injection, les cellules sont replacées à l'étuve pendant 40h. Elles sont alors fixées à la formaldéhyde 4% pendant 15 mn, perméabilisées 5 mn au triton X100 à 0.2% et rincées plusieurs fois avec du tampon phosphate. On procède alors au double marquage pendant 1h à 37°C avec :

15 - un anticorps anti-souris marqué au Texas Red dilué au 1/400, qui révélera les cellules injectées,

- kit Boehringer « In situ cell death detection » qui marquera spécifiquement en vert, les coupures dans l'ADN des cellules apoptotiques.

Les lamelles sont ensuite montées sur lames de verre en milieu de montage
20 (Vectashield-Biosys).

A l'observation en lumière fluorescente, à l'aide de filtres sélectionnant les différentes couleurs, les cellules injectées d'une part et les cellules en apoptose d'autre part, sont comptabilisées.

On obtient ainsi, dans 3 expériences indépendantes, entre 9 et 18% de cellules
25 HCT116 mortes par apoptose au temps 40h. Dans les mêmes conditions, on ne constate la mort d'aucune cellule HCT116 injectée par l'immunoglobuline contrôle.

Les expériences d'enregistrement après microinjection de l'anticorps Mab 1F1, ont été reproduites avec les cellules H460, H1299, HeLa et HKe-3 avec des résultats similaires au graphe présenté dans la figure 3 montrant qu'au moins 50% des cellules injectées meurent de 12 à 60h après injection.

- 5 Les expériences de marquage « TUNEL » ont été réalisées avec les cellules HCT116 et H460 et ont donné des résultats équivalents (de 9 à 18% des cellules entrant en apoptose 40 heures après injection de l'anticorps).

10 **Exemple 5 : Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la viabilité et sur la prolifération des fibroblastes humains normaux NHDF**

5.1 - Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la viabilité des fibroblastes humains normaux NHDF.

- 15 Les expériences d'enregistrement des cellules NHDF en prolifération microinjectées par l'anticorps Mab 1F1 montrent qu'aucune mort cellulaire n'est constatée dans les 60h après injection et que les cellules continuent à se diviser normalement.

5.2 - Effet de la microinjection de l'anticorps Mab 1F1 sur la prolifération des fibroblastes humains normaux NHDF.

- 20 Les cellules normales en culture ont besoin de l'apport en facteurs de croissance. Si elles sont privées de ces facteurs elles entrent dans une phase de « non-prolifération » dite de quiescence où elles ne répliquent plus leur ADN et ne peuvent donc plus incorporer la bromodéoxyuridine, un analogue de la thymidine ajouté dans le milieu de culture, que seules les cellules en prolifération peuvent incorporer dans leur ADN.

Lorsqu'on microinjecte dans des cellules NHDF quiescentes, l'anticorps Mab 1F1 à la concentration de 10 mg/ml, et que l'on remet ces cellules dans un milieu contenant des facteurs de croissance et de la bromodéoxyuridine (BrdU), on constate, après 24h de contact puis fixation et coloration à l'aide d'un anticorps anti-BrdU, une inhibition de 33% de la prolifération cellulaire.

Cette inhibition est calculée en rapportant le pourcentage de cellules injectées par l'anticorps Mab 1F1 et qui ont incorporé la BrdU, au pourcentage de cellules injectées par une immunoglobuline de souris et qui ont incorporé la BrdU (contrôle).

Un autre anticorps monoclonal anti-G3BP (11H7) a été injecté dans les cellules NHDF dans les mêmes conditions.

Anticorps injecté	% d'incorporation BrdU
Immunoglobuline de souris (IgG)	44.7
Mab 1F1	29.7
11H7	30.3

Tableau 1 : effet de l'injection d'anticorps spécifiques de G3BP sur la croissance cellulaire de cellules NHDF

On constate que l'immunoglobuline n'empêche pas la prolifération cellulaire alors que l'anticorps 11H7 a un effet similaire à celui de l'anticorps Mab 1F1, à savoir qu'ils provoquent une inhibition de la prolifération de 32 à 33%.

On attribue cette inhibition au blocage de la protéine G3BP endogène par l'anticorps Mab 1F1 ou 11H7. A cet égard il est intéressant de noter que cet arrêt de prolifération n'est que temporaire dans les cellules normales NHDF et n'entraîne en

aucun cas la mort des cellules. En effet, les cellules reprennent leur cycle normal lorsque l'anticorps est naturellement dégradé dans le cytoplasme (environ 40h après l'injection).

Les résultats présentés dans les exemples 4 et 5 montrent que l'anticorps Mab 1F1 induit l'apoptose dans au moins 50% des cellules tumorales humaines testées dans lesquelles G3BP est surexprimée mais se révèle non toxique lorsqu'il est injecté dans les cellules humaines normales, où G3BP est faiblement exprimée. Cet effet dans les cellules tumorales n'est apparemment pas lié à l'état d'activation des gènes *ras*. Par ailleurs, l'anticorps Mab 1F1, provoque un arrêt temporaire - ou un retard - de la prolifération des cellules normales NHDF, lorsqu'il est injecté dans les cellules quiescentes.

Exemple 6 - Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti -G3BP à partir de l'hybridome G3B 1F1 1D1.

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire reproduisant les propriétés de l'anticorps monoclonal Mab 1F1.

6.1 - Préparation de la séquence d'ADN.

Une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) est préparée selon la technique décrite dans le brevet US 4,946,778. Cette séquence est ensuite placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère.

Les ARN poly A sont isolés à partir d'une culture cellulaire de l'hybridome G3B 1F1 1D1, selon la technique décrite par Chirguin S.H. et al (Biochemistry 18, 5294 (1979)). Ces ARN sont utilisés pour une réaction de Réverse-Transcription à l'aide de primers murins formés d'hexanucléotides aléatoires. Les ADNc obtenus servent de matrice à deux réactions de PCR

- l'une destinée à amplifier le fragment variable de la chaîne lourde (VH) avec des primers VH spécifiques,

- une deuxième PCR permettant d'obtenir le fragment VL, en utilisant un mélange de 10 primers dérivés des séquences murines.

- 5 Deux fragments de 340 bp et 325 bp sont ainsi obtenus et assemblés grâce à un linker qui permet un positionnement correct de l'ADNc de VH en 5' de celui de VL. PCR (Recombinant Phage Antibody System Mouse ScFv Module, Pharmacia, 27-9400-01).

- 10 La séquence d'acides nucléiques fusionnée VH-linker-VL est ensuite insérée dans un phagemide qui permet l'expression de l'anticorps intracellulaire. Cette expression permet facilement l'identification et la sélection des anticorps intracellulaires qui reconnaissent correctement l'antigène. Cette étape est réalisée en sélectionnant les anticorps capables de reconnaître G3BP en test ELISA (Recombinant Phage Antibody System Expression Module, Pharmacia, 27-9401-01).

15 6.2 - Evaluation fonctionnelle de l'anticorps intracellulaire modifié.

- La séquence qui code pour l'anticorps intracellulaire modifié anti-G3BP est isolée du phagemide par restriction, puis insérée dans le vecteur SV2 (Schweighoffer et al., Science, 256, 825-827 (1992)) ou pCDNA3 (InVitrogen, V790-20). Le plasmide ainsi obtenu est appelé pSV-ScFvG3BP ou pCDNA3ScFvG3BP.
- 20 L'évaluation fonctionnelle peut être réalisée au moyen des tests décrits ci-dessous.

- a) par microinjection dans les cellules mammifères non immortalisées NHDF et dans des lignées transformées (HCT116, H460, Hke-3, H1299, Hela) en examinant l'apoptose dans les lignées transformées suivant les techniques décrites précédemment et en mesurant l'impact de l'anticorps intracellulaire anticorps sur la
- 25 viabilité cellulaire par comparaison avec l'activité de l'anticorps Mab 1F1.

b) par un test de néo-résistance sur les lignées transformées et les cellules normales. Le plasmide pCDNA3G3BP est transfecté dans les lignées transformées (HCT116, Hke-3, H460, H1299, Hela) ainsi que dans des cellules humaines non transformées. Trois jours après transfection, les cellules transformées sont
 5 sélectionnées en présence de généticine . Dans ce test, l'anticorps simple chaîne est comparé à des fragments de G3BP (dont les séquences d'acides nucléiques correspondantes sont incluses dans les mêmes vecteurs d'expression) qui inhibent la croissance des cellules tumorales.

c) par l'inhibition de la formation de foyers. La capacité de l'anticorps simple
 10 chaîne à inhiber la formation de foyers est réalisée selon la technique décrite dans WO94/29446. Pour les tests de diminution de la capacité tumorale, l'effet peut également être recherché dans le cas de transformation par d'autres oncogènes que Ras.

d) en recherchant l'impact de l'expression de ce ScFv sur l'activité de liaison à
 15 l'ARN et/ou la coupure endonucléolytique de l'ARN par G3BP1. En effet, l'apoptose induite par microinjection de l'anticorps monoclonal Mab 1F1 peut s'expliquer soit par la dissociation d'une interaction avec un partenaire protéique spécifique, soit par une modification de l'activité de liaison à l'ARN et/ou de clivage endoribonucléolytique. L'anticorps ScFv obtenu peut également être caractérisé par
 20 sa capacité à modifier ces interactions.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

25 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 30 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165

(ii) TITRE DE L'INVENTION: PEPTIDE CAPABLE DE SE LIER AU DOMAINE SH3 DE LA PROTEINE GAP.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 466 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met Val Met Glu Lys Pro Ser Pro Leu Leu Val Gly Arg Glu Phe Val
1 5 10 15

Arg Gln Tyr Tyr Thr Leu Leu Asn Gln Ala Pro Asp Met Leu His Arg
20 25 30

Phe Tyr Gly Lys Asn Ser Ser Tyr Val His Gly Gly Leu Asp Ser Asn
35 40 45

Gly Lys Pro Ala Asp Ala Val Tyr Gly Gln Lys Glu Ile His Arg Lys
50 55 60

Val Met Ser Gln Asn Phe Thr Asn Cys His Thr Lys Ile Arg His Val
65 70 75 80

Asp Ala His Ala Thr Leu Asn Asp Gly Val Val Val Gln Val Met Gly
85 90 95

Leu Leu Ser Asn Asn Asn Gln Ala Leu Arg Arg Phe Met Gln Thr Phe
100 105 110

Val Leu Ala Pro Glu Gly Ser Val Ala Asn Lys Phe Tyr Val His Asn
115 120 125

Asp Ile Arg Tyr Gln Asp Glu Val Phe Gly Gly Phe Val Thr Glu Pro
130 135 140

Gln Glu Glu Ser Glu Glu Glu Val Glu Glu Pro Glu Glu Arg Gln Gln

	145		150		155		160									
	Thr	Pro	Glu	Val	Val	Pro	Asp	Asp	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Asp	Gln	Ala
					165					170					175	
5	Val	Val	Ser	Asn	Asp	Met	Glu	Glu	His	Leu	Glu	Glu	Pro	Val	Ala	Glu
				180					185					190		
	Pro	Glu	Pro	Asp	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Gln	Glu	Pro	Val	Ser	Glu
10				195					200					205		
	Ile	Gln	Glu	Glu	Lys	Pro	Glu	Pro	Val	Leu	Glu	Glu	Thr	Ala	Pro	Glu
		210					215					220				
15	Asp	Ala	Gln	Lys	Ser	Ser	Ser	Pro	Ala	Pro	Ala	Asp	Ile	Ala	Gln	Thr
	225					230					235					240
	Val	Gln	Glu	Asp	Leu	Arg	Thr	Phe	Ser	Trp	Ala	Ser	Val	Thr	Ser	Lys
					245					250					255	
20	Asn	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Pro	Val	Thr	Gly	Ile	Pro	Pro	His
				260					265					270		
	Val	Val	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Gln	Pro	Arg	Pro	Glu	Ser	Lys	Pro	Glu
25			275					280					285			
	Ser	Gln	Ile	Pro	Pro	Gln	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp	Gln	Arg	Val	Arg	Glu
		290					295					300				
30	Gln	Arg	Ile	Asn	Ile	Pro	Pro	Gln	Arg	Gly	Pro	Arg	Pro	Ile	Arg	Glu
	305					310					315					320
	Ala	Gly	Glu	Gln	Gly	Asp	Ile	Glu	Pro	Arg	Arg	Met	Val	Arg	His	Pro
					325					330					335	
35	Asp	Ser	His	Gln	Leu	Phe	Ile	Gly	Asn	Leu	Pro	His	Glu	Val	Asp	Lys
				340					345					350		
	Ser	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Phe	Gln	Ser	Tyr	Gly	Asn	Val	Val	Glu	Leu
40			355					360					365			
	Arg	Ile	Asn	Ser	Gly	Gly	Lys	Leu	Pro	Asn	Phe	Gly	Phe	Val	Val	Phe
		370					375					380				
45	Asp	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	Gln	Lys	Val	Leu	Ser	Asn	Arg	Pro	Ile	Met
	385					390					395					400
	Phe	Arg	Gly	Glu	Val	Arg	Leu	Asn	Val	Glu	Glu	Lys	Lys	Thr	Arg	Ala
					405					410					415	
50	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Arg	Arg	Asp	Asn	Arg	Leu	Arg	Gly	Pro	Gly	Gly
				420					425					430		

Pro Arg Gly Gly Leu Gly Gly Gly Met Arg Gly Pro Pro Arg Gly Gly
 435 440 445

5 Met Val Gln Lys Pro Gly Phe Gly Val Gly Arg Gly Leu Ala Pro Arg
 450 455 460

Gln Glx
 465

10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2 :

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 2129 paires de bases
 15 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

	GCTTGCCTGT CAGGTCGACT CTAGAGCCCG GGTACCGAGC TCGAATTCGG CGGGGTTTGT	60
30	ACTATCCTCG GTGCTGTGGT GCAGAGCTAG TTCCTCTCCA GCTCAGCCGC GTAGGTTTGG	120
	ACATATTTAC TCTTTTCCCC CCAGGTTGAA TTGACCAAAG CAATGGTGAT GGAGAAGCCT	180
	AGTCCCCTGC TGGTCGGGCG GGAATTTGTG AGACAGTATT ACACACTGCT GAACCAGGCC	240
35	CCAGACATGC TGCATAGATT TTATGGAAAG AACTCTTCTT ATGTCCATGG GGGATTGGAT	300
	TCAAATGGAA AGCCAGCAGA TGCAGTCTAC GGACAGAAAG AAATCCACAG GAAAGTGATG	360
40	TCACAAAAC TACCAACTG CCACACCAAG ATTGCCATG TTGATGCTCA TGCCACGCTA	420
	AATGATGGTG TGGTAGTCCA GGTGATGGGG CTTCTCTCTA ACAACAACCA GGCTTTGAGG	480
	AGATTCATGC AAACGTTTGT CTTGCTCCT GAGGGGTCTG TTGCAAATAA ATTCTATGTT	540
45	CACAATGATA TCTTCAGATA CCAAGATGAG GTCTTTGGTG GGTGTGTAC TGAGCCTCAG	600
	GAGGAGTCTG AAGAAGAAGT AGAGGAACCT GAAGAAAGCA GCAAACACCT GAGGTGGTAC	660
50	CTGATGATTC TGGAACTTT TATGATCAGG CAGTTGTCTG TAATGACATG GAAGAACATT	720
	TAGAGGAGCC TGTGCTGAA CCAGAGCCTG ATCCTGAACC AGAACCAGAA CAAGAACCTG	780

	TATCTGAAAT	CCAAGAGGAA	AAGCCTGAGC	CAGTATTAGA	AGAAACTGCC	CCTGAGGATG	840
	CTCAGAAGAG	TTCTTCTCCA	GCACCTGCAG	ACATAGCTCA	GACAGTACAG	GAAGACTTGA	900
5	GGACATTTTC	TTGGGCATCT	GTGACCAGTA	AGAATCTTCC	ACCCAGTGGA	GCTGTTCCAG	960
	TTACTGGGAT	ACCACCTCAT	GTTGTTAAAG	TACCAGCTTC	ACAGCCCCGT	CCAGAGTCTA	1020
	AGCCTGAATC	TCAGATTCCA	CCACAAAGAC	CTCAGCGGGA	TCAAAGAGTG	CGAGAACAAC	1080
10	GAATAAATAT	TCCTCCCCAA	AGGGGACCCA	GACCAATCCG	TGAGGCTGGT	GAGCAAGGTG	1140
	ACATTGAACC	CCGAAGAATG	GTGAGACACC	CTGACAGTCA	CCAACTCTTC	ATTGGCAACC	1200
15	TGCCTCATGA	AGTGGACAAA	TCAGAGCTTA	AAGATTTCTT	TCAAAGTTAT	GGAAACGTGG	1260
	TGGAGTTGCG	CATTAACAGT	GGTGGGAAAT	TACCCAATTT	TGGTTTTGTT	GTGTTTGATG	1320
	ATTCTGAGCC	TGTTTCAGAA	GTCCTTAGCA	ACAGGCCCAT	CATGTTTCAGA	GGTGAGGTCC	1380
20	GTCTGAATGT	CGAAGAGAAG	AAGACTCGAG	CTGCCAGGGA	AGGCGACCGA	CGAGATAATC	1440
	GCCTTCGGGG	ACCTGGAGGC	CCTCGAGGTG	GGCTGGGTGG	TGGAATGAGA	GGCCCTCCCC	1500
25	GTGGAGGCAT	GGTGCAGAAA	CCAGGATTTG	GAGTGGGAAG	GGGGCTTGCG	CCACGGCAGT	1560
	AATCTTCATG	GATCTTCATG	CAGCCATACA	AACCCTGGTT	CCAACAGAAT	GGTGAATTTT	1620
	CGACAGCCTT	TGGTATCTTG	GAGTATGACC	CCAGTCTGTT	ATAAACTGCT	TAAGTTTGTA	1680
30	TAATTTTACT	TTTTTTGTGT	GTAAATGGTG	TGTGCTCCCT	CTCCCTCTCT	TCCCTTTCCT	1740
	GACCTTTAGT	CTTTCAC TTC	CAATTTTGTG	GAATGATATT	TTAGGAATAA	CGGACTTTTA	1800
35	CCCGAATTCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCGTGTGAA	ATTGTTATCC	GCTCACAATT	1860
	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG	TGTAAAGCCT	GGGGTGCCTA	ATGAGTGAGC	1920
	TAACTCACAT	TAATTGCGTT	GCGCTCACTG	CCCGCTTTC	AGTCGGGAAA	CCTGTCGTGC	1980
40	CAGCGCATTA	ATGAATCGGC	CAACGCGCGG	GGAGAGGCGG	TTTGCGTATT	GGGCGCCAGG	2040
	GTGGTTTTCT	TTTCACCAGT	GAGACGGGCA	ACAGCTGATT	GCCCTTCACC	GCTGGCCCTG	2100
45	AGAGAGTTGC	AGCAAGCGGT	CCACGCTGG				2129

REVENDEICATIONS

1. Anticorps monoclonal dirigé contre la protéine G3BP et capable d'induire l'apoptose dans différents types de cellules tumorales.

2. Anticorps monoclonal capable de reconnaître un épitope compris entre les
5 acides aminés situés aux positions 1 et 144 de la protéine G3BP.

3. Anticorps monoclonal capable de reconnaître un épitope compris entre les acides aminés situés aux positions 72 et 144 de la protéine G3BP.

4. Anticorps selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il s'agit de l'anticorps Mab 1F1 , sécrété par la lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 déposée le 9
10 juin 1998 auprès de la C.N.C.M. sous le numéro I-2038.

5. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4 pour l'obtention d'un médicament.

6. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendication. 1 à 4 pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des désordres
15 hyperprolifératifs.

7. Composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 4, éventuellement mélangés à un support pharmaceutiquement acceptable, ladite quantité étant thérapeutiquement efficace pour induire l'apoptose dans des cellules
20 tumorales.

8. Lignée d'hybridome susceptible de sécréter des anticorps monoclonaux selon l'une des revendications 1 à 4.

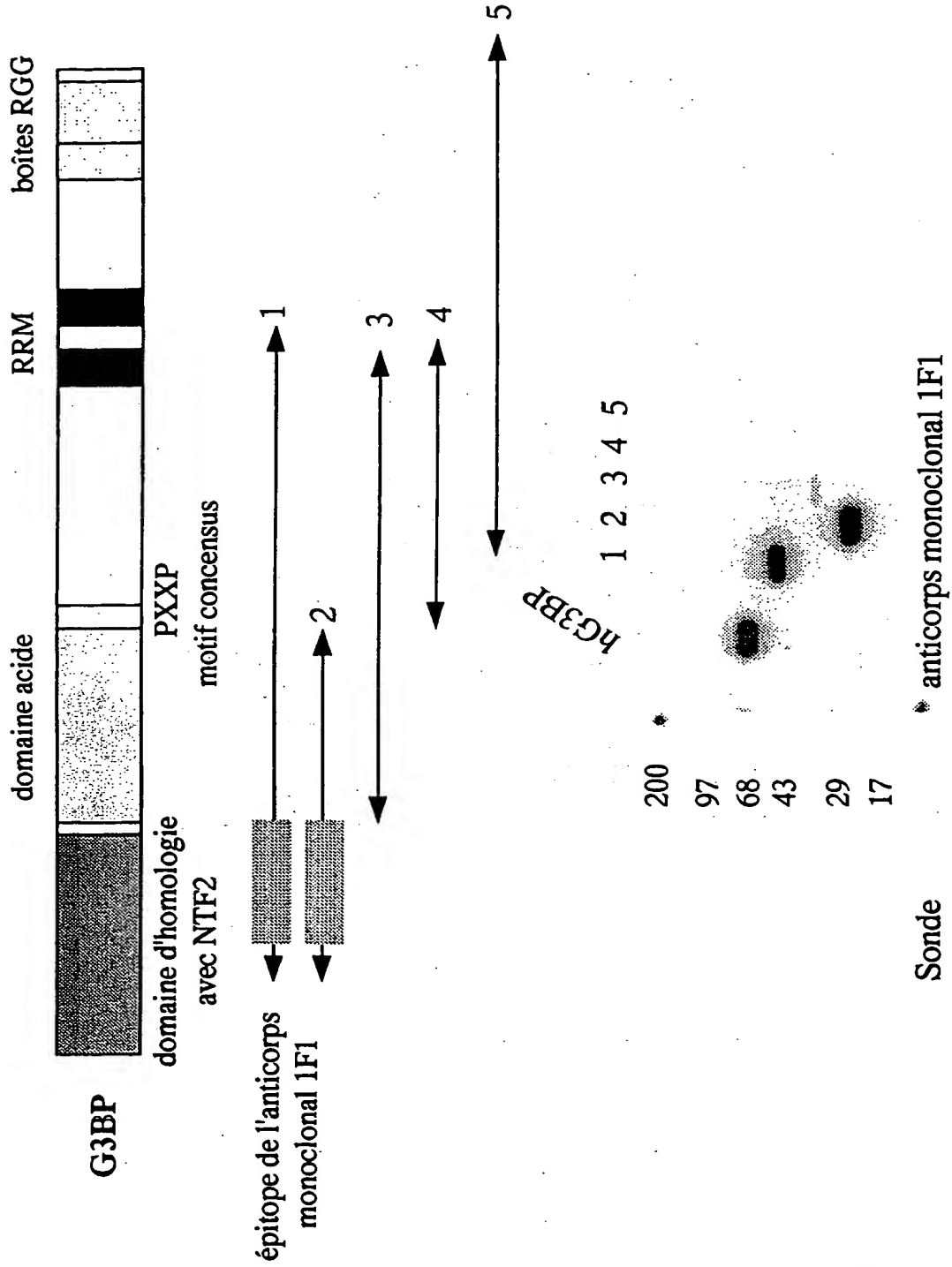
9. Lignée d'hybridome G3B 1F1 1D1 déposée le 9 juin 1998 auprès de la C.N.C.M. sous le numéro de dépôt I- 2038.

10. Procédé de production d'anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales caractérisé en ce qu'il comprend (1) la fusion de cellules spléniques d'un animal immunisé à l'aide de la protéine G3BP ou d'un fragment comprenant au moins une partie du domaine N-terminal (aa 1-144),
5 avec des cellules myelomateuses dans des conditions permettant la formation d'hybridomes; (2), la détection et l'isolement de ceux desdits hybridomes qui sécrètent des anticorps monoclonaux capables d'induire l'apoptose dans différentes lignées tumorales.

11. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4 , comme
10 réactif de diagnostique.

12. Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps selon l'une des revendications 1 à 4.

ORIGINAL

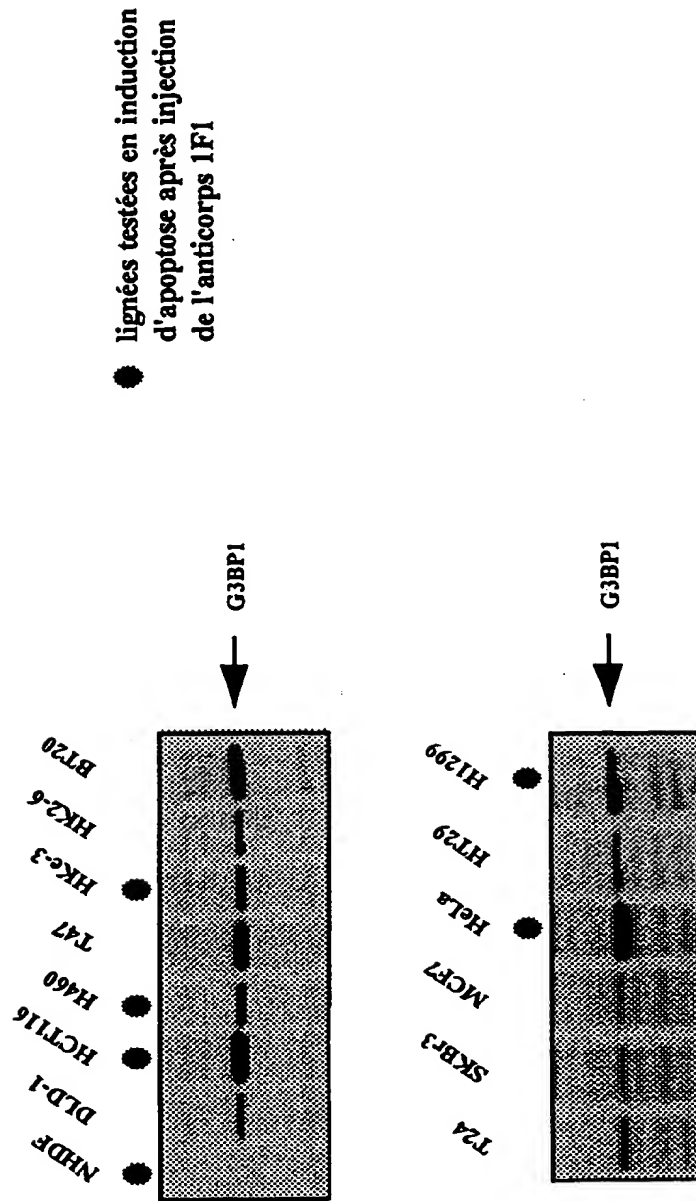


ORIGINAL

Figure 1

NIVEAU D'EXPRESSION DE G3BP1 DANS DIFFERENTES LIGNEES

CELLULAIRES HUMAINES.

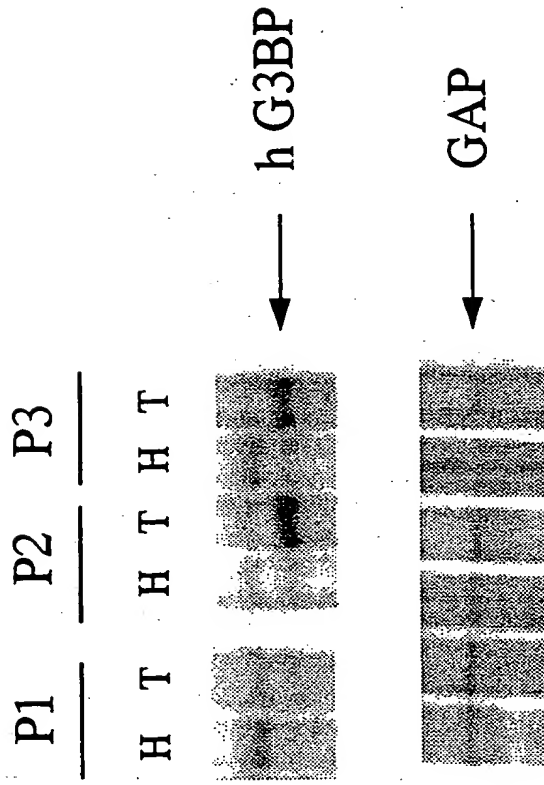


Western blot: anti-G3BP MAb 1F1

Figure 2(a)

ORIGINAL

SUREXPRESSION DE G3BP DANS LES TUMEURS COLORECTALES HUMAINES



P1: Polype
P2 : Adénome moyennement différencié Moderately Differentiated Adenocarcinoma
P3 : Adénome bien différencié

Figure 2(b)

ORIGINAL

EFFET DE L'INJECTION DU MAb 1F1 SUR LA
VIABILITE DES CELLULES HCT116

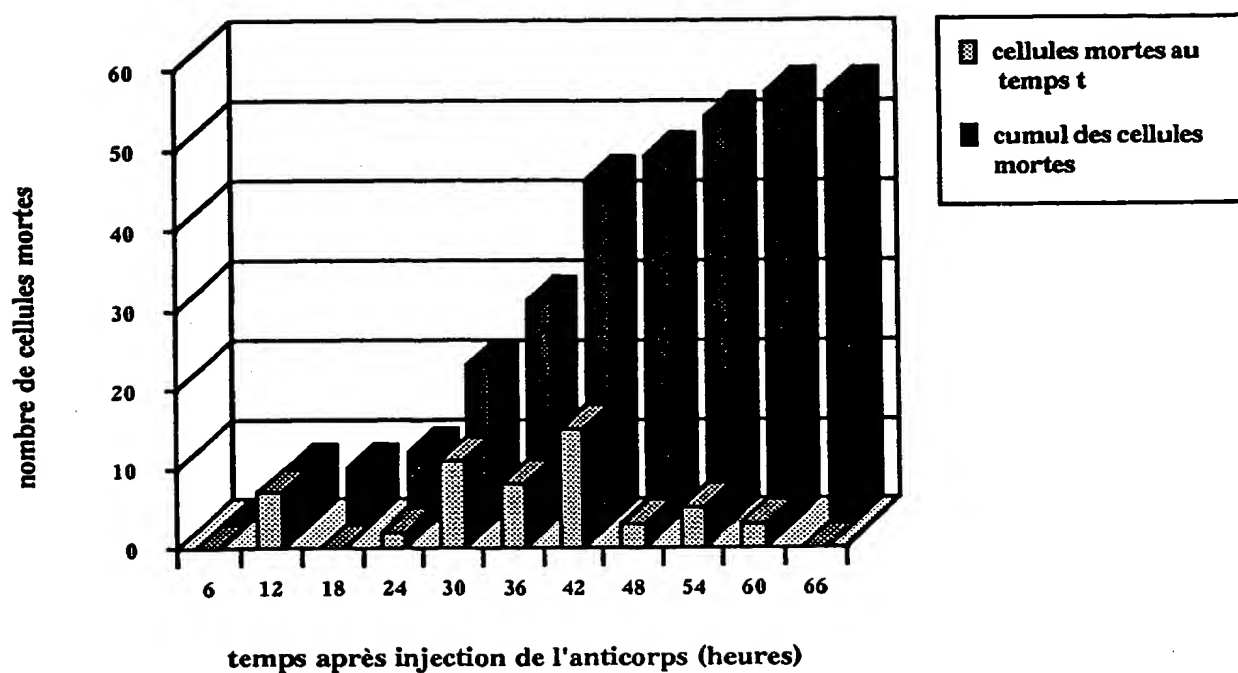


Figure 3

ORIGINAL